

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 161 137**

⑫ Número de solicitud: 009900957

⑬ Int. Cl.⁷: C12Q 1/68

⑭

PATENTE DE INVENCION

B1

⑮ Fecha de presentación: **07.05.1999**⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **16.11.2001**Fecha de concesión: **16.05.2002**⑰ Fecha de anuncio de la concesión: **16.06.2002**⑱ Fecha de publicación del folleto de patente:
16.06.2002⑲ Titular/es: **Consejo Superior de
Investigaciones Científicas
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES
Universidad de Santiago de Compostela**⑳ Inventor/es: **González Sotelo, M^o del Carmen;
Medina Méndez, M^a Isabel;
Pérez Martín, Ricardo Isaac;
Quinteiro Vázquez, Javier y
Rey Méndez, Manuel**㉑ Agente: **No consta**㉒ Título: **Procedimiento para la identificación de albacora (Thunnus alalunga) en conservas de atún blanco, albacora o bonito del norte.**

㉓ Resumen:

Procedimiento para la identificación de albacora (Thunnus alalunga) en conservas de atún blanco, albacora o bonito del norte.

El procedimiento se caracteriza por amplificar un fragmento de 187 pb denominado BDR, del gen del citocromo b, localizado en el ADN mitocondrial, por la utilización secuencial de dos endonucleasas de restricción sobre dicho fragmento amplificado, y por el análisis de los fragmentos resultantes que permiten diferenciar la especie Albacora de otras especies susceptibles de ser empleadas como substitutas de la misma en productos enlatados etiquetados como conservas de Atún blanco, Albacora o Bonito del Norte, tales como Rabil (Thunnus albacares), Rojo (Thunnus thynnus), Patudo (Thunnus obesus), Listado (Katsuwonus pelamis), Bonito Sarda (Sarda sarda), Bacoreta (Euthynus alleteratus) y Melva (Auxis thazard). De aplicación en el sector alimentario.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. C/Panamá, 1 - 28036 Madrid

ES 2 161 137 B1

DESCRIPCION

Procedimiento para la identificación de albacora (*Thunnus alalunga*) en conservas de atún blanco, albacora o bonito del norte.

Campo de la invención

La invención se refiere a un procedimiento para identificar y diferenciar una especie de túnido de elevado valor comercial, la Albacora (*Thunnus alalunga*), de otras especies susceptibles de ser empleadas como substitutos de la misma en productos enlatados etiquetados como conservas de Atún blanco, Albacora o Bonito del Norte. El procedimiento propuesto puede aplicarse también a cualquier tipo de producto fresco, cocido, congelado, refrigerado, etc. La invención tiene aplicación en el sector de la industria de transformación de alimentos, más concretamente en el campo de la Identificación o Control de Origen de Especies empleadas para la elaboración de productos pesqueros.

Antecedentes de la invención

Durante los últimos años, los intercambios comerciales han puesto de manifiesto algunos problemas relacionados con el correcto etiquetado de los productos y que tienen una particular incidencia en el caso del sector pesquero, debido a la elevada variedad tanto de especies como de procesos de transformación y/o conservación existentes. La reglamentación sobre la rotulación de los alimentos ha aumentado considerablemente en los últimos años, sobre todo, en la dirección de obligar a que se indiquen ciertas características tales como la composición nutricional, la lista completa de ingredientes y, en algunos casos, sus proporciones. Ello se debe, fundamentalmente, a una preocupación creciente, tanto de los consumidores como de la administración, de estar informados de los alimentos que se comercializan, bien por su incidencia en la salud, bien por su calidad o por su precio. Este es el caso de la industria de conservas de túnidos con un número considerable de especies susceptibles de ser empleadas en la elaboración de dichos productos. Los grados de calidad y de aceptación de estas conservas en el consumidor pueden llegar a ser muy diferentes redundando por ello en su precio en el mercado. Un requisito fundamental es que el producto indicado en la etiqueta sea el que se encuentre dentro del envase y pueda ser identificado de forma inequívoca. Para ello es preciso disponer de las técnicas analíticas adecuadas que permitan determinar los constituyentes del alimento y su proporción.

En la legislación española vigente se recogen distintas rotulaciones para las conservas de túnidos en función de la materia prima empleada (Tabla 1).

TABLA 1

Especies de túnidos comerciales y sus denominaciones normalizadas en el mercado español (BOE, 1984)

Denominación común	Denominación científica	Denominación
Atún	<i>Thunnus thynnus</i>	Atún
Rabil	<i>Thunnus albacares</i>	Atún
Patudo	<i>Thunnus obesus</i>	Atún
Listado	<i>Katsuwonus pelamis</i>	Atún
Albacora	<i>Thunnus alalunga</i>	Atún blanco - Albacora o atún blanco - (Bonito del Norte)
Bonito	<i>Sarda sarda</i>	Bonito sarda
Bacoreta	<i>Euthynnus alleteratus</i>	Bacoreta
Melva	<i>Auxis thazard</i>	Melva

La Albacora o Atún Blanco es la especie de túnido más apreciada comercialmente en España. Esto hace que exista un posible beneficio económico en su sustitución por especies de menor valor comercial, tales como otras especies del género *Thunnus* (Rabil, Patudo o Rojo) u otras especies de túnidos (Listado, Bacoreta o Melva). Sin embargo, la identificación de una especie dada, una vez sometida al proceso de esterilización, resulta prácticamente imposible con la metodología que se emplea actualmente para otros productos. Ante la carencia de un método de identificación, las especies de túnidos en conserva se han identificado por su apariencia, olor, textura y color en un intento grosero de diferenciarlas.

Cuando el pescado está fresco o congelado pero intacto, la mayoría de las especies pueden ser diferenciadas por sus caracteres taxonómicos morfológicos. Cuando el producto ha sido sometido a operaciones como fileteado o eviscerado, donde algunos de estos caracteres se han perdido, hay que recurrir al empleo de caracteres taxonómicos bioquímicos para su identificación. El problema se complica cuando la especie se somete a un procesamiento térmico, como es el caso de la conserva, ya que además de que la mayoría de sus atributos se han modificado, un gran número de sus constituyentes bioquímicos sufren alteraciones debidas a la acción del calor. Esto hace que la metodología utilizada para la identificación de los productos no procesados no proporcione resultados satisfactorios en el caso de las conservas.

Teniendo en cuenta que los atributos morfológicos son un reflejo de las diferencias genéticas, las técnicas analíticas que puedan diferenciar los componentes genéticos específicos, como son las proteínas y los ácidos nucleicos, serán los métodos idóneos para la identificación de la especie.

Recientemente, se ha puesto de manifiesto la posibilidad de identificar especies de túnidos mediante los patrones de isoelectroenfoque generados por los péptidos obtenidos tras la digestión de las proteínas del músculo enlatado con bromuro de cianógeno. Sin embargo, la técnica presenta problemas a la hora de diferenciar especies muy relacionadas filogenéticamente, por ejemplo, las pertenecientes al género *Thunnus* (Mackie et al., 1992) [véase el apartado relativo a la BIBLIOGRAFIA]. Otras desventajas son la baja reproducibilidad de los patrones electroforéticos y un tiempo de análisis excesivamente largo.

Otras aproximaciones incluyen el análisis de ácidos nucleicos, debido a que sufren un menor deterioro tras el tratamiento térmico, permitiendo la determinación de especies en productos alimentarios. Por otro lado, podrían dar una mayor información acerca de diferencias específicas debido a que cada aminoácido proteico estaría determinado por un codón (triplete de bases). Tanto el ADN mitocondrial (ADNmt) como el nuclear pueden ser utilizados para el análisis de especies. El ADNmt se utiliza preferentemente para la identificación de especies por ser de tamaño menor que el nuclear, existir más copias del ADNmt dentro de una misma célula y no presentar secuencias no codificantes (intrones).

Diversas estrategias basadas en el análisis del ADNmt, como por ejemplo la amplificación específica de ADN o la digestión de ADN amplificado con enzimas de restricción, se han empleado para realizar estudios de diferenciación de especies o poblaciones en productos tales como huevas de esturión, caracoles, carne de cetáceos, etc., (Borgo et al., 1996, DeSalle y Birstein, 1996; Baker y Palumbi, 1994). En el caso de la diferenciación de túnidos con fines biológicos se ha utilizado la amplificación y posterior secuenciación de fragmentos del ADNmt para la diferenciación de cuatro especies (Barlett & Davidson, 1991). Estos mismos autores, en la solicitud de patente PCT WO92/05277, han descrito un procedimiento de identificación de cualquier especie que incluye la amplificación a partir del empleo de una pareja de cebadores determinada y el análisis genético de las secuencias del fragmento generado, mostrando el caso concreto de la identificación de dichas especies de túnidos (Davidson y Barlett, 1992). Dicho método es adecuado para la identificación de dichas especies cuando no han sido sometidas a un procesamiento térmico. Sin embargo, en el caso de las conservas, la amplificación de ADN por ellos planteada obtiene rendimientos muy bajos o inexistentes, imposibilitando su análisis (Quinteiro et al., 1998). Recientemente, se han publicado las secuencias de otros cebadores que producen rendimientos suficientes en reacciones de amplificación utilizando ADN de conservas de túnidos. Unseld et al. (1995) proponen la utilización de un fragmento cuya información es insuficiente para distinguir todas las especies de túnidos que pueden ser empleadas comercialmente en una conserva. En el trabajo de Quinteiro et al. (1998) se propone una metodología para la identificación de seis especies de túnidos, sin embargo, en ella no se contempla ni la posible presencia de Bacoreta o ni de Melva como posibles substitutos. La metodología propuesta por estos autores es tanto el análisis de distancias genéticas basadas en secuencias, como la digestión mediante tres enzimas de restricción del fragmento de PCR [reacción de amplificación en cadena de la polimerasa] generado por los cebadores antes mencionados y el análisis electroforético de los fragmentos de restricción. Existe, por consiguiente, la necesidad de disponer de un procedimiento para la identificación de *Thunnus alalunga* en conservas que supere la totalidad o parte de los inconvenientes previamente mencionados en relación con los métodos analíticos convencionales.

Bibliografía

Baker, C.S.- Palumbi, S.R. (1994). *Which whales are hunted? A molecular genetic approach to monitoring whaling.* Science, 265:1538-1539.

Barlett, S.E., Davidson, W.S. (1991). *Identification of Thunnus tuna species by the Polymerase Chain Reaction and direct sequence analysis of their mitochondrial cytochrome b genes* Can. J. Fish. Aquat. Sci. 48:309-317.

BOE (1984). Real Decreto 1521/1984.

Borgo, R., Souty-Grosset, C., Bouchon, D., Gomot, L. (1996). *PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA for identification of snail meat species.* J. Food Sci. 61(1):1-4.

Davidson, W.S., Bartlett, S.L (1992). *Test to determine an organism's species and/or population identity by direct nucleotide sequence analysis of defined segments of its genome.* Solicitud de patente PCT publicada el 2.04.92 con el n° de publicación WO 92/05277.

DeSalle, R. and Birstein, V.J. (1996). *PCR identification of black caviar.* Nature 361(6579):197-198.

Downs, T.R., Wilfinger, W.W (1983). *Fluorometric quantification of DNA in cells and tissue.* Anal. Biochem, 131:538-547.

Heuskeshoven, J., and Dermick, R. (1985). *Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining.* Electrophoresis 6:103-112.

Mackie, I.M., Chalmers, M., Reece, P., Scobbie, A.E., Ritchie, A.H. (1992) *The application of electrophoretic techniques to the identification of species of canned tuna and bonito.* En: Pelagic fish, the resource and its exploitation. Editores: Burt, J.R., Hardy, R., Whittle, K.J. Fishing News Books, Oxford.

Quinteiro, J., Sotelo, C.G., Rehbein, H., Pryde, S.E., Medina, I., Pérez-Martín, R.I., Rey-Méndez, M., Mackie I.M. (1998). *The use of mtDNA direct PCR-sequencing and PCR-RFLP methodologies in species identification of canned tuna.* J. Agr. Food Chem. 46:1662-1669

Ram, J.L., Ram, M.L. and Baidoun, F.F. (1996). *Authentication of canned tuna and bonito by sequence and restriction site analysis of polymerase chain reaction products of mitochondrial DNA.* J. Agric. Food Chem. 44:2460-2467.

Unsold, M., Beyermann, B., Brandt, P., and Hiesel, R. (1995). *Identification of the species origin of highly processed meat products by mitochondrial DNA sequences.* PCR Meth. Applic. 4:241-243.

Compendio de la invención

El objetivo de la invención es la identificación de la especie Albacora (*Thunnus alalunga*) en productos enlatados etiquetados como conservas de Atún blanco, Albacora o Bonito del Norte, La invención se basa en la amplificación de un fragmento determinado del gen del citocromo b del ADNmt, y en el estudio de las diferencias presentes en su secuencia nucleotídica entre la especie Albacora (*Thunnus alalunga*) y las de aquellas otras especies que pueden ser empleadas como substitutas de la misma: Rabil (*Thunnus albacares*), Rojo (*Thunnus thynnus*), Patudo (*Thunnus obesus*), Listado (*Katsuwonus pelamis*), Bonito Sarda (*Sarda sarda*), Bacoreta (*Euthynus alleteratus*) y Melva (*Auxis thazard*). Sobre la base de esas diferencias interespecíficas se presentan dos endonucleasas de restricción cuya utilización genera patrones electroforéticos característicos de la especie Albacora. La novedad de la técnica que aquí se presenta estriba en el hecho de proporcionar al usuario la secuencia de cebadores que permiten la amplificación efectiva de un fragmento específico de la Albacora en conserva así como de las otras siete especies de túnidos susceptibles de ser empleadas como substitutos de ésta. Sobre dicho fragmento se han seleccionado dos endonucleasas de restricción específicas que, basándose en el análisis de los fragmentos de restricción por ellas generados, permiten diferenciar la Albacora de las otras especies. La técnica utilizada en el procedimiento proporcionado por esta invención se caracteriza por su bajo coste, su sencillez y rapidez frente a la secuenciación, y, frente a la técnica de enzimas de restricción propuesta por Quinteiro et al. (1998) tiene la ventaja de que se usan dos enzimas de restricción en lugar de tres, y la posibilidad de diferenciar la Albacora de la Melva y la Bacoreta.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra el esquema del protocolo a seguir para la identificación de la Albacora (*Thunnus alalunga*) en conserva.

La Figura 2 muestra un gel de agarosa en donde se pone de manifiesto la eficiencia de la amplificación en las 8 especies de túnidos utilizando los cebadores BDR-L y BDR-H. Las calles corresponden con las siguientes muestras de la derecha a la izquierda: Standard de Peso Molecular, A1, A1, B3, B3, Rb2, Rb2, Ro7, Ro7, P1, P1, M6, M6, S1, S1. Las abreviaturas corresponden a las muestras: A=Albacora, Rb=Rabil, Ro=Rojo, P=Patudo, L=Listado, S=Sarda, B=Bacoreta, M=Melva. Los números se corresponden con diferentes individuos analizados.

La Figura 3 representa la secuencia del fragmento BDR en la especie Albacora mostrando las dianas de las enzimas Sca I y Stu I. La secuencia de dicho fragmento se muestra en la SEC. ID. N°: 3 Las secuencias subrayadas corresponden a los cebadores para la PCR.

La Figura 4 muestra el esquema de la diferenciación entre las 8 especies de túnidos obtenida tras la digestión del fragmento BDR con las enzimas Sca I y Stu I. Las abreviaturas corresponden a las siguientes muestras: A=Albacora, RB=Rabil, RO=Rojo, P=Patudo, L=Listado, S=Sarda, B=Bacoreta, M=Melva.

La Figura 5 muestra la separación electroforética de los fragmentos de restricción del amplicón BDR generados mediante la digestión con la enzima Sca I. Las abreviaturas corresponden a las siguientes muestras: MW: Patrón comercial de ADN de diferentes pesos moleculares; A=Albacora, RB=Rabil, RO=Rojo, P=Patudo, L=Listado, S=Sarda, B=Bacoreta, M=Melva. Los números se corresponden con diferentes individuos analizados.

La Figura 6 muestra la separación electroforética de los fragmentos de restricción del amplicón BDR generados mediante digestión con la enzima Stu I. Las abreviaturas corresponden a las siguientes muestras: MW: Patrón comercial de ADN de diferentes pesos moleculares, A=Albacora, RB=Rabil, RO=Rojo, P=Patudo, L=Listado, S=Sarda, M=Melva. Los números se corresponden con los diferentes individuos analizados.

La Figura 7 muestra un gel de agarosa donde se pone de manifiesto la eficiencia de la amplificación en las 10 muestras comerciales utilizando los cebadores BDR-L y BDR-H. Los números corresponden a diferentes muestras comerciales. La primera calle de la izquierda se corresponde con el Standard de Peso Molecular.

La Figura 8 muestra la separación electroforética de los fragmentos de restricción del amplicón BDR generados mediante la digestión con las enzimas Sca I y Stu I. Los números corresponden a diferentes muestras comerciales. La primera calle de la izquierda se corresponde con el Standard de Peso Molecular.

Descripción detallada de la invención

La invención proporciona un procedimiento para la identificación de la especie Albacora (*Thunnus alalunga*) en productos enlatados (conservas), particularmente en productos enlatados comerciales rotulados como conservas de Atún Blanco, Albacora o Bonito del Norte. El procedimiento de la presente invención se caracteriza por la amplificación de un fragmento denominado BDR del gen del citocromo b, localizado en el ADNmt, de 187 pb, por la utilización secuencial de dos endonucleasas de restricción sobre dicho fragmento. y por el análisis de los fragmentos resultantes que permiten diferenciar la especie Albacora de otras especies susceptibles de ser empleadas como substitutas de la misma: Rabil (*Thunnus albacares*), Rojo (*Thunnus thynnus*), Patudo (*Thunnus obesus*), Listado (*Katsuwonus pelamis*), Bonito Sarda (*Sarda sarda*), Bacoreta (*Euthynnus alleteratus*) y Melva (*Auris thazard*). La metodología a utilizar sigue los pasos que se detallan a continuación y que se muestran en la Figura 1.

Metodología:

1. Extracción del ADN.
2. Amplificación del fragmento BDR del gen del citocromo b.

3. Comprobación de la amplificación.

4. Diseño de un conjunto de endonucleasas de restricción específicas.

5 5. Posible concentración de amplicones.

6. Digestión de alícuotas del fragmento BDR con endo-nucleasas de restricción que reconozcan y corten las secuencias AGT!ACT y AGG!CCT.

10 7. Estudio de los fragmentos de restricción resultantes.

A continuación se describirá detalladamente cada una de las etapas mencionadas.

1. *Preparación de reactivos y material de laboratorio*

15

Todas las soluciones y el material que se emplea en la extracción y en la amplificación de ADN deben de estar libres de ADN contaminante, para lo cual se esterilizarán los reactivos así como el material de plástico o vidrio que se utilice (tubos eppendorf, espátulas, pinzas, etc.).

20 2. *Extracción y purificación del ADN*

Se precisa realizar una extracción de ADN correspondiente a un mismo miotomo de músculo, eliminando el aceite o líquido de cobertura. En la bibliografía pueden encontrarse diversos procedimientos de extracción de ADN a partir de músculo de pescado (véase, por ejemplo, Barlett and Davidson, 1991).
 25 Los principales problemas en la extracción del ADN en el caso de una conserva están originados por la degradación del ADN durante el proceso de cocción y esterilización de la misma ya que se dificulta la extracción de concentraciones suficientes de ADN de elevada calidad (se encuentran fragmentos con un tamaño de 500 pb [pares de bases] mientras que en pescado fresco el tamaño oscila entre 20.000-500 pb). Es preciso conseguir cantidades significativas de ADN suficientemente conservado para aplicar la técnica
 30 de diferenciación de especies que se describe en esta invención. El ADN extraído debe ser adecuado para la amplificación y debe contener suficiente información como para permitir la diferenciación de las especies. Asimismo, el tamaño de los fragmentos resultantes de la extracción debe ser menor o igual que el mayor fragmento de ADN extraído y estar cercano al tamaño promedio para evitar la existencia de un elevado número de moléculas de ADN de menor tamaño, las cuales dificultarían la amplificación
 35 posterior.

Una vez extraído, es importante purificar el ADN eliminando otros componentes como las proteínas, carbohidratos y fragmentos de ADN de tamaño menor a 100 pb.

40 3. *Obtención del fragmento amplificado BDR*

3.1. *Reacción de amplificación (PCR)*

Alícuotas de ADN purificado se someten a la Reacción de Amplificación en Cadena de la Polimerasa
 45 (PCR) con objeto de obtener el fragmento BDR de 187 pares de bases, localizado en una sección del gen del citocromo b.

Para ello se utilizan disoluciones de dos cebadores, denominados respectivamente BDR-L y BDR-H, cuyas estructuras se corresponden con las siguientes secuencias de nucleótidos [véase el apartado relativo
 50 a la LISTA DE SECUENCIAS]:

BDR-L: SEC. ID. N°: 1 (23 nucleótidos)
 BDR-H: SEC. ID. N°: 2 (34 nucleótidos)

Las bases de la secuencia de nucleótidos se han representado utilizando el código de una sola letra para
 55 expresar los caracteres de la secuencia de nucleótidos, de acuerdo con lo establecido por la IUPAC-IUB en Nucleic Acids Research 13, 3021-3030 (1985) y en The Biochemical Journal 219, No. 2, 345-373 (1984), concretamente: A: adenina, C: citosina, G: guanina, T: timina, M: A o C; S: G o C; N:A, C, T o G; Y: C o T; H: A, C O T; D: A, G o T.

60 El diseño de los cebadores se realizó teniendo en cuenta una serie de posiciones en las que puede encontrarse más de una base en las secuencias de las distintas especies de tñidos estudiadas. Estos cebadores pueden obtenerse mediante síntesis realizada por distintas casas comerciales (por ejemplo, Amersham

Pharmacia Biotech).

La reacción de amplificación en cadena de la polimerasa se lleva a cabo en un termociclador sometiendo las muestras a un programa de ciclos de temperatura adecuado para obtener unos rendimientos elevados del producto de amplificación, por ejemplo, un programa de ciclos de temperatura (BDR-PG) tal como el que se muestra en la Tabla 2.

TABLA 2
PCR: Programa de ciclos de temperatura (BDR-PG)

Etapas	Temperatura	Tiempo
Inicial	94°C	2 minutos
Ciclo (x35)	94°C	20 segundos
	52°C	20 segundos
	72°C	50 segundos
Final	72°C	6 minutos

4. Comprobación de la eficiencia de la amplificación

Es preciso comprobar la eficacia de la amplificación. Puede emplearse para ello cualquier técnica apropiada, por ejemplo, una electroforesis en un gel de agarosa (Figura 2). Los productos de amplificación pueden visualizarse mediante iluminación con una lámpara de UV (ultravioleta). Debe emplearse un patrón de pesos moleculares, con fragmentos de ADN comprendidos entre 100 y 2.000 pb para estimar el peso molecular de los fragmentos amplificados.

5. Concentración de los productos de PCR

Puede ser preciso realizar una concentración previa de los productos de amplificación para llevar a cabo con eficacia la digestión con la endonucleasa de restricción y la visualización de los fragmentos resultantes. El grado de concentración de las muestras dependerá de la sensibilidad de las técnicas empleadas para visualizar los fragmentos resultantes de la digestión.

6. Digestión con endonucleasas de restricción

El fragmento BDR de las especies de túnidos analizadas presenta una serie de posiciones adecuadas para el diagnóstico en su secuencia nucleotídica. Estas posiciones, características de cada especie, permiten seleccionar dos endonucleasas de restricción, concretamente, las enzimas Sca I y Stu I que actuarán secuencialmente. La primera de ellas (Sca I) distingue las especies pertenecientes al género *Thunnus* de las demás y la segunda diferencia la Albacora del Rabil, Rojo y Patudo.

La enzima Sca I reconoce la secuencia diagnóstica: AGT!ACT de las especies pertenecientes al género *Thunnus*: Albacora, Rabil, Rojo y Patudo (Figura 3) originando en el fragmento BDR de estas especies un corte en la posición 104 que da como resultado dos segmentos de unidades 83 pb y 104 pb respectivamente (Figura 4). Los fragmentos BDR de todas las demás especies, Listado, Bacoreta, Melva y Sarda, no resultan digeridos con esta enzima.

La enzima Stu I reconoce la secuencia AGG!CCT que se encuentra en el fragmento BDR de la especie Albacora, Melva y Sarda, originando en las mismas un corte en la posición 53 que da como resultado dos segmentos de unidades 53 pb y 134 pb respectivamente. Rabil, Rojo, Patudo, Listado y Bacoreta no presentan esta secuencia y, por tanto, después de la reacción enzimática sus correspondientes fragmentos BDR no son digeridos en ninguna posición.

La digestión del fragmento BDR se realiza con las enzimas Sca I y Stu I empleando el tampón adecuado y las condiciones de tiempo y temperatura óptimas para la actuación de las mismas. Las reacciones

de digestión suelen incubarse durante 10-15 horas a la temperatura de 37°C.

7. Estudio de los fragmentos de restricción resultantes

El resultado de la digestión debe visualizarse para obtener los patrones de fragmentos de cada especie. Las muestras que se identificarán en base a la enzima Sca I, como Albacora, Rabil, Rojo o Patudo presentarán un patrón electroforético de dos fragmentos, de 104 y 83 pb, mientras que las demás especies mostrarán el fragmento no digerido de 187 pb (Figura 5). Posteriormente, las muestras que se identifiquen como la especie Albacora de acuerdo con los perfiles obtenidos tras la digestión con la enzima Stu I presentarán un patrón de dos fragmentos, de 53 y 134 pb, mientras que las demás especies mostrarán el fragmento no digerido de 187 pb (Figura 6).

A modo de resumen, en una realización particular, la invención proporciona un procedimiento para la identificación de la especie Albacora (*Thunnus alalunga*) en una muestra a ensayar que comprende las etapas de:

- a) obtener la muestra del producto a ensayar;
- b) extraer y purificar el ADN de la muestra del producto a ensayar, en una cantidad suficiente para poder efectuar una reacción de amplificación en cadena de la polimerasa (PCR);
- c) amplificar mediante PCR un fragmento de ADN presente en el ADN extraído, denominado BDR, contenido en el gen del citocromo b, localizado en el ADN mitocondrial, de 187 pares de bases (pb), cuya secuencia de nucleótidos se corresponde a la SEC. ID. N°: 3, mediante el empleo de los cebadores identificados como BDR-L y BDR-H, cuyas secuencias de nucleótidos corresponden a las SEC ID. N°: 1 y SEC. ID. N°: 2, respectivamente,
- d) analizar la presencia o ausencia de amplicones BDR;
- e) digerir los amplicones obtenidos con enzimas de restricción que reconozcan la diana de restricción AGT!ACT y la diana de restricción AGG!CCT, y
- f) analizar los productos de digestión resultantes y compararlos con un patrón de fragmentos de restricción del fragmento BDR de Albacora que presenta (i) un fragmento de 104 pb y otro de 83 pb tras la digestión con la enzima de restricción que reconoce la diana de restricción AGT!ACT, y (ii) un fragmento de 53 pb y otro fragmento de 134 pb tras la digestión con la enzima de restricción que reconoce la diana de restricción AGG!CCT.

El procedimiento proporcionado por esta invención puede aplicarse también a cualquier tipo de producto fresco, cocido, congelado, refrigerado, etc.

El siguiente ejemplo sirve para ilustrar la invención y no debe ser considerado como limitativo del alcance de la misma.

Ejemplo

Identificación de la especie Albacora en conservas

Se plantea el problema de identificar la especie Albacora en 10 conservas comerciales etiquetadas como Albacora o Atún Blanco.

1. Extracción de ADN

Se realizó la extracción de ADN de una muestra de 3 g de músculo enlatado correspondiente a un mismo miotomo. Se eliminó el exceso de aceite o de líquido de cobertura con papel de filtro, se homogeneizó el músculo y se tomaron 0,3 g para llevar a cabo la metodología que a continuación se describe.

Se transfieren 150 mg de músculo previamente homogeneizado a un tubo de 2 ml con 860 µl de Tampón 1 (1 % SDS, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, TRIS-HCl 10 mM, pH 8).

Se agita el tubo suavemente y se añaden 100 µl de tiocianato de guanidina (5 M) y 40 µl de una disolución de Proteinasa K (20 mg/ml en agua).

ES 2 161 137 B1

El tubo se agita suavemente, se cierra y se incuba durante 2 horas a 56°C.

Se le añaden de nuevo 40 μ l de la disolución de Proteinasa K (20 mg/ml en agua) y se incuba durante
5 10-14 horas a 56°C.

Posteriormente se centrifuga el tubo durante 5 minutos a 11.600 x g. El sobrenadante se recoge y se realiza una nueva centrifugación del mismo con objeto de eliminar todo el material particulado.

10 2. Purificación del ADN

El procedimiento que aquí se describe utiliza el kit WIZARD DNA Clean-Up System (PROMEGA Corporation, Madison WI USA, Cat. A7280). Como equipamiento se necesita una bomba de vacío, un kitasato, una goma de vacío y un Vac-Man (PROMEGA Corporation, Madison WI USA, Cat. A7231).

15 Para realizar el proceso es preciso acoplar una minicolumna Wizard a una jeringa Wizard mediante el cierre Luer-Lok y ambos se ensamblan al Vac-Man colocado en el kitasato.

20 Se transfiere 1 ml de resina Wizard a un tubo de 1,5 ml y sobre él se añaden 500 μ l del sobrenadante, se mezcla el contenido de este tubo varias veces por inversión. A continuación, se transfiere el contenido del tubo a la jeringa Wizard acoplada al sistema de vacío, de tal forma que se hace pasar líquido a través de la minicolumna quedando retenida la resina con las moléculas de ADN adheridas a la misma.

25 Una vez eluido el disolvente, se procede a un lavado con 2 ml de isopropanol al 80 % acoplando de nuevo el vacío.

La eliminación del isopropanol residual tiene una elevada importancia. Para ello, se retira la jeringa Wizard y se coloca la minicolumna Wizard en un tubo eppendorf (1,5 ml). A continuación se centrifuga dicho eppendorf durante 20 segundos a 11.600 x g. El isopropanol remanente se ha filtrado situándose
30 en el fondo del eppendorf.

Una vez realizada esta centrifugación, se retira la minicolumna del eppendorf y se introduce en uno nuevo. Se añaden sobre la minicolumna 50 μ l de agua Milli-Q precalentada (70°C). Se deja reposar durante 1 minuto y se centrifuga nuevamente durante 20 segundos a 11.600 x g. Se desprecia la minicolumna
35 y el ADN purificado se recupera del fondo del eppendorf (volumen aproximado de 50 μ l).

3. Cuantificación del ADN extraído

Es importante cuantificar la cantidad de ADN extraído ya que se necesita una cantidad mínima para
40 realizar la reacción de amplificación de la polimerasa. En las condiciones utilizadas en nuestro laboratorio, la cantidad mínima de ADN extraído de músculo de pescado enlatado es de 0,20 μ g. Uno de los procedimientos más utilizados para cuantificar el ADN de un extracto emplea un método fluorimétrico basado en un ensayo con bisbenzimidazol (Hoechst 33258) (Downss and Wilfinger, 1983).

45 Se prepara una recta de calibrado comprendida entre 10 y 125 ng ADN/ml en un tampón II acuoso que contiene 10 % en volumen del tampón TNE (100 Tris mM, EDTA 10 mM, NaCl 2 M, pH 7,4) y 0,005 % del reactivo HOECHST 33258 (Molecular Probes, Leiden, Holanda. Cat H-3569). Se emplea para ello un stock de ADN de timo de ternera (Calf Thymus) (2 μ g/ml) de Sigma. La concentración de ADN en el extracto se mide añadiendo 2 ml de tampón II a una alícuota de 2,2 μ l del extracto de ADN. Se
50 registra la fluorescencia a longitudes de onda de excitación/emisión 350/455 nm, utilizando como blanco el tampón II sin ADN. La concentración de ADN de la muestra se obtiene por interpolación de la lectura del fluorímetro en la recta de calibrado previamente obtenida.

Para las muestras ensayadas las concentraciones obtenidas se encontraron en tomo a los 100 μ g de
55 ADN/ml de extracto.

4. Reacción de amplificación (PCR)

Para ello se utilizan disoluciones (40 μ M) de los dos cebadores, denominados respectivamente BDR-L
60 y BDR-H [SEC ID. N°: 1 y SEC. ID. N°: 2, respectivamente].

La reacción de la polimerasa se lleva a cabo en un eppendorf (0,5 ml), donde una alícuota de 2-4 μ l

de la disolución de ADN extraído (0,2-1 μ g) se pone en contacto con una solución que contiene NTP 200 μ M, Tris-CIH 10 mM, pH 8,3, KCl 50 mM, Mg^{2+} 2,5 mM, 0,625 U de la enzima Taq Polimerasa y 0,24 μ M de cada uno de los dos cebadores. El volumen final se ajusta a 50 μ l.

5. *Comprobación de la eficiencia de la amplificación*

Se empleó una electroforesis en un gel de agarosa al 4 % en tampón TAE (Tris acetato 40 mM, pH 8,5, EDTA 2 mM), con 0,5 μ g de bromuro de etidio/ml de gel (Figura 7). Los productos de la amplificación (5 μ l) se visualizaron mediante iluminación con una lámpara de UV. Se empleó un patrón de pesos moleculares, con fragmentos de ADN comprendidos entre 100 y 2.000 pb para estimar el peso molecular de los fragmentos amplificados (100 Base-Pair Ladder, de Amersham Pharmacia Biotech).

6. *Concentración de los productos de amplificación*

Los productos de amplificación se concentraron 5 veces mediante la utilización de microconcentradores Micron-30 con un punto de corte de 100 pb (Amico, USA).

7. *Digestión de productos de PCR con enzimas de restricción*

Los productos de PCR se digirieron con las enzimas Sca I y Stu I separadamente. La digestión se realizó en tubos eppendorf, donde alícuotas de 1-2,5 μ l de los productos de amplificación previamente concentrados se digirieron con 0,5 U de las enzimas, 1 μ l del tampón adecuado a cada enzima, completando el volumen de reacción hasta 10 μ l con agua. Las reacciones de digestión se incuban durante 10-15 horas a la temperatura óptima de cada enzima: 37°C respectivamente para Sca I y Stu I.

8. *Estudio de los fragmentos de restricción resultantes*

Se analizaron los fragmentos resultantes de la digestión con las dos endonucleasas mediante una separación electroforética y la posterior visualización de los perfiles obtenidos. La separación de los fragmentos se realizó utilizando el equipo GenePhor (Amersham Pharmacia Biotech) y geles de poliacrilamida comerciales de esa misma casa (GeneGel Excel 12,5 %/24, Amersham Pharmacia Biotech). Las condiciones usadas para realizar la separación electroforética fueron las siguientes: 600 voltios, 15 mA, 8 watios y 15°C. La visualización de los fragmentos se llevó a cabo empleando la tinción de plata descrita por Heuskeshoven y Dermick (1985) (Figura 8) Las muestras que se identifican como Albacora, presentan, en base a la digestión con la enzima Sca I, un patrón electroforético de dos fragmentos, de 104 y 83 pb, y en base a la digestión con la enzima Stu I un patrón de dos fragmentos, de 53 y 234 pb.

En la Tabla 3 se detallan los resultados obtenidos tras la digestión con las enzimas Sca I y Stu I en las 10 muestras analizadas. Se identificaron 5 de las muestras como de la especie Albacora y otras 5 como no Albacora.

TABLA 3
Resultados del análisis por RFLP de las muestras en conserva

Clave de la muestra	Identificación
1	Albacora
2	No Albacora
3	No Albacora
4	Albacora
5	Albacora

TABLA 3 (Continuación)

Clave de la muestra	Identificación
6	No Albacora
7	No Albacora
8	Albacora
9	No Albacora
10	Albacora

Lista de secuencias

(1) INFORMACION GENERAL:

(i) SOLICITANTE

(A) NOMBRE: CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS

(B) CALLE: Serrano, 113

(C) CIUDAD: Madrid

(D) PROVINCIA: Madrid

(E) PAIS: España

(F) CODIGO POSTAL (ZIP): 28006

(G) TELEFONO: 91 585 50 00

(H) FAX: 91 411 30 77

(ii) TITULO DE LA INVENCION:

PROCEDIMIENTO PARA LA IDENTIFICACION DE ALBACORA (*Thunnus alalunga*) EN CONSERVAS DE ATUN BLANCO, ALBACORA O BONITO DEL NORTE

(iii) NUMERO DE SECUENCIAS: 3

(iv) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:

(A) TIPO DE SOPORTE: Floppy disk

(B) ORDENADOR: IBM PC compatible

(C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Versión #1.30 (OPE)

(2) INFORMACION DE LA SECUENCIA IDENTIFICADA N° (SEC. ID. N°): 1

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 23 bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) NUMERO DE CADENAS: sencilla

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ácido nucleico

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC ID. N°: 1:

GCMAACGGSG CNTCYTTCTT CTT

23

ES 2 161 137 B1

(2) INFORMACION DE LA SEC: ID. N°: 2

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 34 bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) NUMERO DE CADENAS: sencilla
- (D) TOPOLOGIA: lineal

(ii)) TIPO DE MOLECULA: ácido nucleico

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC ID. N°: 2

TGACGGTAGC HCCTCAGAAD GACATTTGTC CTCA

34

(2) INFORMACION DE LA SEC. ID. N°: 3

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 187 bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) NUMERO DE CADENAS: sencilla
- (D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ácido nucleico

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 3:

GCMAACGGSG CNTCYTTCTT CTTTCATCTGC ATCTACTTCC ATATTGGCCG AGGCCTTTAC
TACGGCTCCT ACCTCTACAA AGAAACATGA AACATCGGCG TAGTACTCCT ACTCCTAGTA
ATGATGACCG CCTTCGTCGG CTACGTCCTT CCCTGAGGAC AAATGTCNTT CTGAGGNGCT
ACCGTCA

187

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la identificación de la especie Albacora (*Thunnus alalunga*) en una muestra a ensayar que comprende las etapas de:

a) obtener la muestra del producto a ensayar;

b) extraer y purificar el ADN de la muestra del producto a ensayar, en una cantidad suficiente para poder efectuar una reacción de amplificación en cadena de la polimerasa (PCR);

c) amplificar mediante PCR un fragmento de ADN presente en el ADN extraído, denominado BDR, contenido en el gen del citocromo b, localizado en el ADN mitocondrial, de 187 pares de bases (pb), cuya secuencia de nucleótidos se corresponde a la SEC. ID N°: 3, mediante el empleo de los cebadores identificados como BDR-L y BDR-H, cuyas secuencias de nucleótidos corresponden a las SEC ID. N°: 1 y SEC. ID. N°: 2, respectivamente;

d) analizar la presencia o ausencia de amplicones BDR;

e) digerir los amplicones obtenidos con enzimas de restricción que reconozcan la diana de restricción AGT!ACT y la diana de restricción AGG!CCT; y

f) analizar los productos de digestión resultantes y compararlos con un patrón de fragmentos de restricción del fragmento BDR de Albacora que presenta (i) un fragmento de 104 pb y otro de 83 pb tras la digestión con la enzima de restricción que reconoce la diana de restricción AGT!ACT y (ii) un fragmento de 53 pb y otro fragmento de 134 pb tras la digestión con la enzima de restricción que reconoce diana de restricción AGG!CCT.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha muestra a ensayar procede de una conserva o de un producto enlatado rotulado como Atún blanco, Albacora o Bonito del Norte.

3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en el que la muestra a ensayar procede de un único miotomo de producto enlatado.

4. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la PCR se realiza mediante el siguiente programa de ciclos de temperatura:

Etapas	Temperatura	Tiempo
Inicial	94°C	2 minutos
Ciclo (x35)	94°C	20 segundos
	52°C	20 segundos
	72°C	50 segundos
Final	72°C	6 minutos

5. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la enzima que reconoce la diana de restricción AGT!ACT es la enzima Sca I, y la enzima que reconoce la diana de restricción AGG!CCT es la Stu I.

6. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el análisis de los productos de la digestión enzimática se lleva a cabo mediante separación electroforética de los fragmentos y visualización de los mismos por tinción de plata.

7. Procedimiento según la reivindicación 1 adecuado para identificar diferenciar la especie Albacora (*Thunnus alalunga*) de otras especies de túnidos susceptibles de ser empleadas como substitutas de la misma seleccionadas entre Rabil (*Thunnus albacares*), Rojo (*Thunnus thynnus*), Patudo (*Thunnus obesus*), Listado (*Katsuwonus pelamis*), Bonito Sarda (*Sarda sarda*), Bacoreta (*Euthynnus alleteratus*) y Melva (*Auris thazard*).

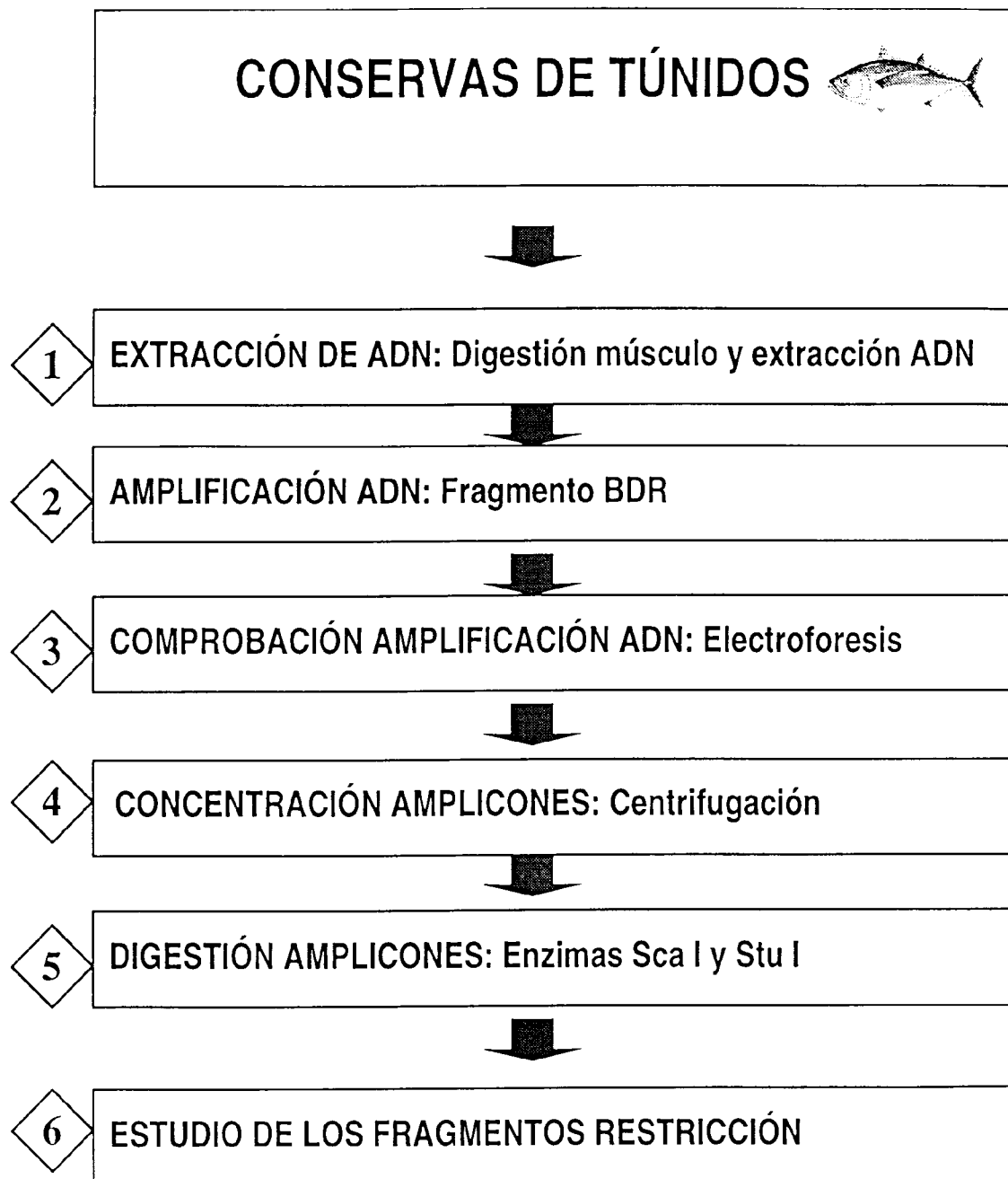


Figura 1

ES 2 161 137 B1

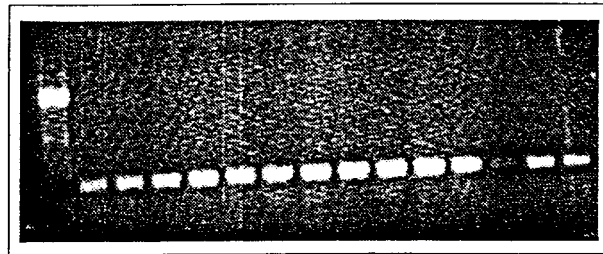


Figura 2

5'-GCMAACGGSGCNTCYTTCTTCTT CATCTGCATC TACTTCCATA TTGGCCGAGG
CCTTTACTAC GGCTCCTACC TCTACAAAGA AACATGAAAC ATCGGCGTAG
TACTCCTACT CCTAGTAATG ATGACCGCCT TCGTCGGCTA CGTCCTTCCC
TGAGGACAAATGTCNTTCTGAGGNGCTACCGTCA- 3'

Figura 3

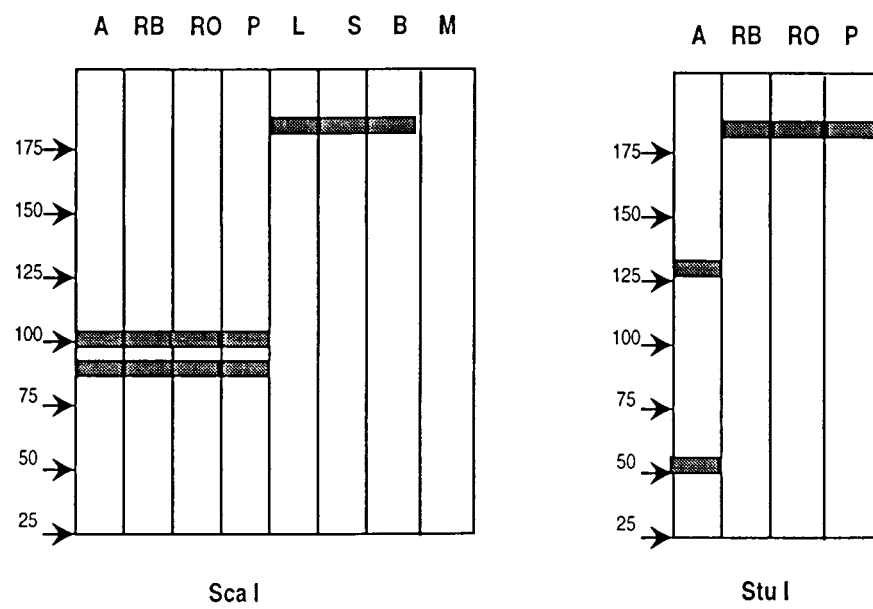


Figura 4

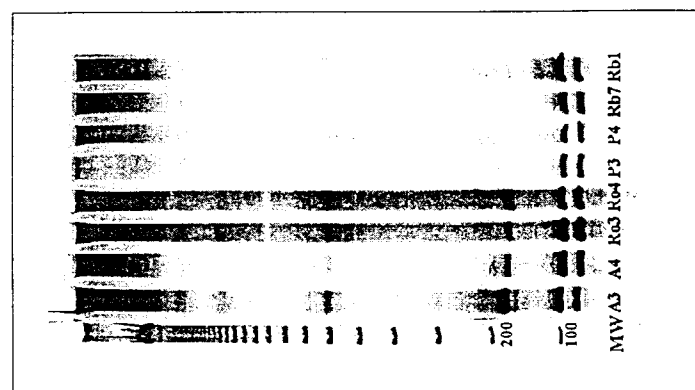
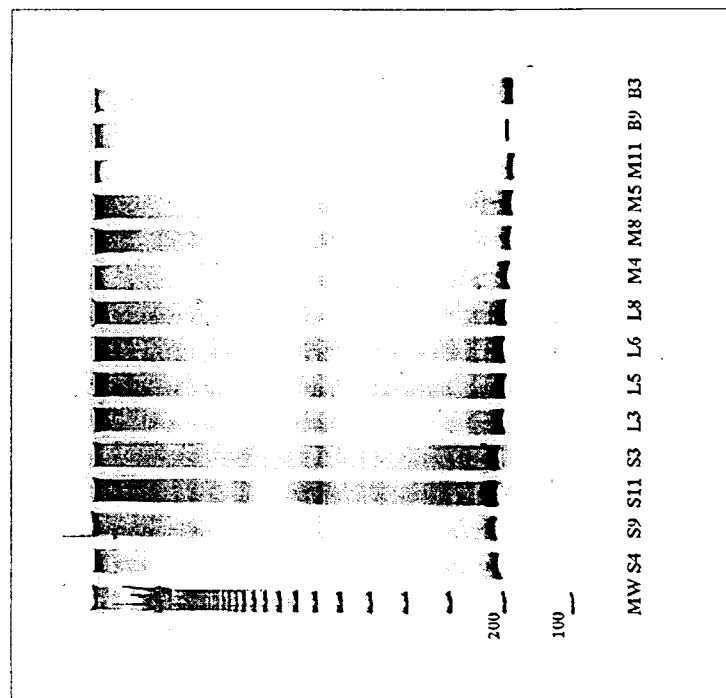


Figura 5

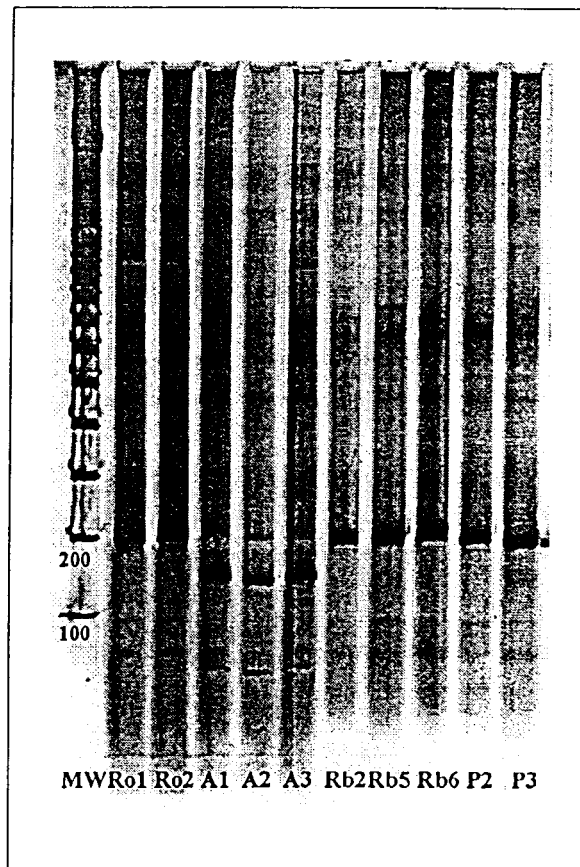


Figura 6

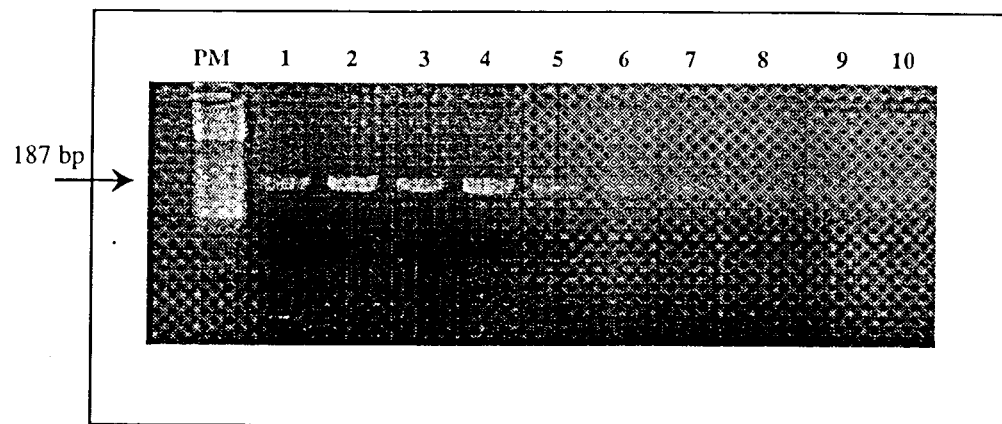


Figura 7

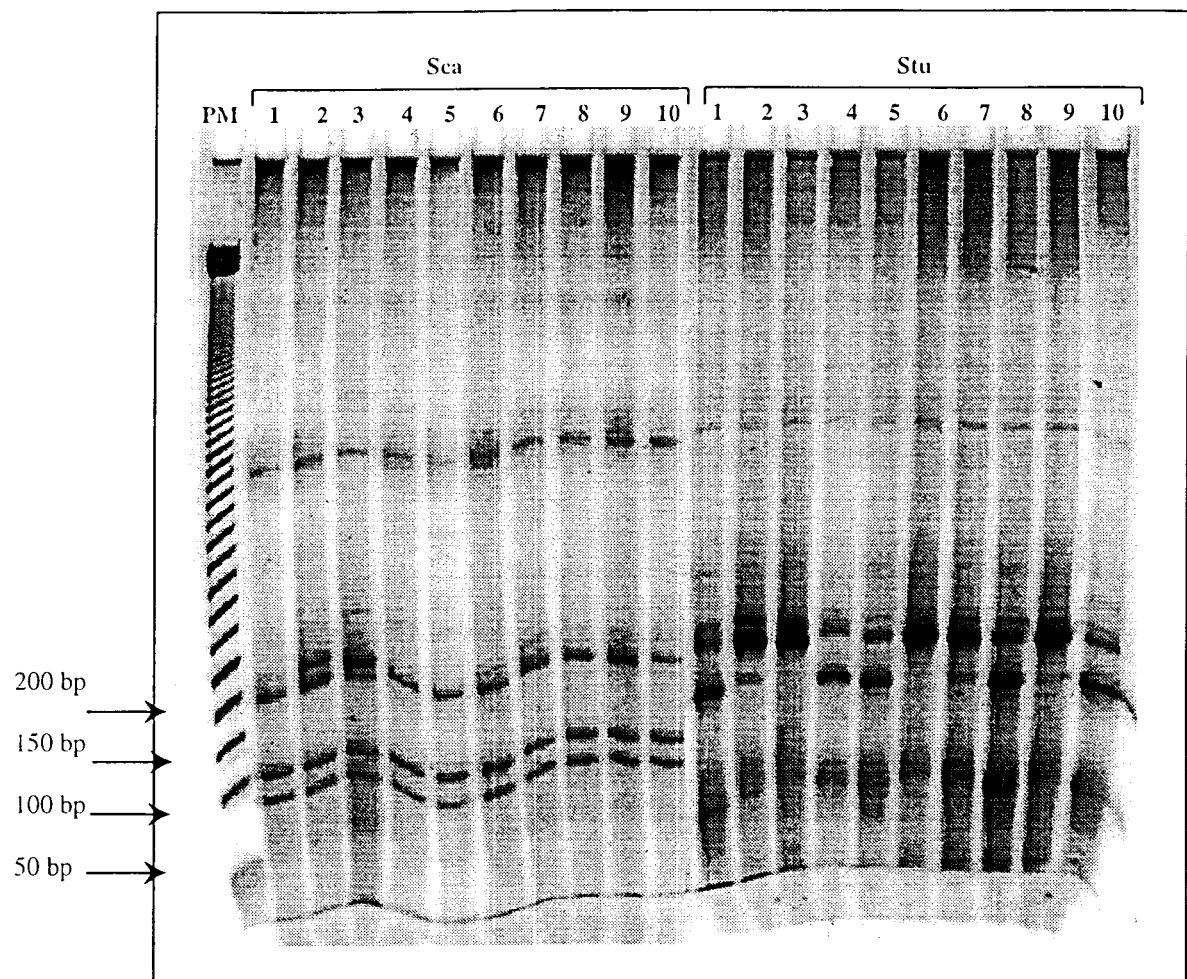


Figura 8



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

- ⑪ ES 2 161 137
⑫ N.º solicitud: 009900957
⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 07.05.1999
⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑮ Int. Cl.⁷: C12Q 1/68

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	RAM, J.L. et al. "Authentication of canned Tuna and Bonito by sequence and restriction site analysis of polymerase chain reaction products of mitochondrial DNA", J. AGRIC. FOOD CHEM., 1996, Vol. 44, páginas 2460-2467. Todo el documento.	1-7
Y	QUINTEIRO, J. et al. "Use of mtDNA direct polymerase chain reaction (PCR) sequencing and PCR-restriction fragment length polymorphism methodologies in species identification of canned Tuna", J. AGRIC. FOOD CHEM., 1998, Vol. 46, páginas 1662-1669. Todo el documento.	1-7
A	CHOW, S. et al. "Intra- and interspecific restriction fragment length polymorphism in mitochondrial genes of Thunnus tuna species", BULL. NAT. RES. INST. FAR SEAS FISH., 1993, N° 30, páginas 207-225. Todo el documento.	1-7
A	CHOW, S. et al. "Phylogenetic relationships between tuna species of the genus Thunnus (Scombridae: Teleostei): Inconsistent implications from morphology, nuclear and mitochondrial genomes", J. MOL. EVOL., 1995, Vol. 41, páginas 741-748. Todo el documento.	1-7

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones n°:

Fecha de realización del informe
22.10.2001

Examinador
J.L. Vizán Arroyo

Página
1/1